

Studentoppgave 11. semester

Profesjonsstudiet i medisin



Student: Bjarne Alexander Berntsen

Veileder: Professor Lars Mørkrid, RH

”Påvisning av kroppsfremmed EPO i urin hos idrettsutøvere”

Abstract

Recombinant Human EPO (rhEPO) became commercially available in the late 1980s for treatment of anaemias related to kidney failure, cancer and AIDS. RhEPO accelerates the erythropoiesis and increase the amount of red blood cells (RBC) in human circulation, and thereby oxygen delivery to the body's tissues. It was soon discovered that it also could be used in healthy athletes as a doping agent in endurance sports, as oxygen delivery to the muscles is the main performance limiting factor here.

RhEPO was banned by the International Olympic Committee (IOC) in 1990, but an effective test was not available until the year 2000. During the 1990s use of rhEPO and its analogues were quite prevalent in sports such as cycling, track & field and cross-country skiing. After the effective test was implemented during the 2000 Olympic Games in Sydney, Australia we have had quite a few high profile cases including skiers, runners and cyclists.

RhEPO is made from Chinese hamster ovary cells (CHO) and has a different glycosylation pattern than endogenous human EPO. The effective test relies on separating these isoforms by Isoelectric Focusing (IEF) because of their different isoelectric properties, with endogenous EPO being more acidic than rhEPO. An other form called Darbepoetin α has become available at a later stage and is also detectable by the same procedure, as this is more acidic than endogenous EPO. The main challenge to detect use is that the detection window for the agent is only about a week after its last administration.

Innhold

	Side
1. Innledning	4
2. Metode	7
3. Resultater	8
3.1 EPO- egenskaper, struktur og isoformer	8
3.2 Deteksjon av EPO-bruk hos idrettsutøvere	9
3.2.1 Indirekte metoder	9
3.2.2 Direkte metoder	10
3.2.3 Positivitetskriterier for rhEPO i urin	11
3.2.4 Positivitetskriterier for NESP i urin	11
3.3 Deteksjonsvindu for Epoietin α , Epoietin β og Darbepoetin α	12
3.4 Akkreditering	12
3.5 Statistiske overveielser	13
3.5.1 Presisjon	14
3.5.2 Nøyaktighet	14
3.5.3 Sensitivitet	14
3.5.4 Spesifisitet	14
3.5.5 Prevalens	14
3.5.6 Positiv og negativ prediktiv verdi	14
4. Diskusjon	16
4.1 Nåværende utfordringer	16
4.2 Fremtidige utfordringer	18
5. Referanser	19

1. Innledning

Doping i idretten er intet nytt fenomen. Allerede under olympiadene i antikkens Hellas eksisterte det beretninger om at stimulerende midler ble brukt (1). De olympiske idealene raskere, sterkere, høyere lever videre i vår tid, og våre idrettshelter blir ofte gjenstand for stor beundring for sine prestasjoner. Sammen med de økende økonomiske gevinstene innen idretten bidrar dette til at enkelte utøvere er villige til å risikere både liv og helse i sin søken etter bedre resultater. Vi hører stadig om idrettsutøvere som blir avslørt etter bruk av stimulerende midler, og metodene blir stadig mer avanserte og vanskeligere å avsløre.

En viktig begrensning i utholdenhetsidrett er blodets evne til å frakte oksygen til arbeidende muskulatur. Metoder til å øke denne kapasiteten har vært interessant for enkelte utøvere å benytte seg av. Allerede på 1980-tallet verserte det rykter om bloddoping ved regulære blodtransfusjoner (1), og en ny utfordring kom mot slutten av dette tiåret da recombinant human EPO (rhEPO) ble tilgjengelig.

Siden 1985 har rhEPO vært tilgjengelig for terapeutisk bruk i bestemte former for anemi (11, 23). Dette gjelder blant annet ved nyresykdommer, AIDS og enkelte kreftsykdommer (23). Det ble fort oppdaget at EPO-injeksjoner også kunne brukes hos friske mennesker med den hensikt å øke hematokrittverdien og hemoglobinkonsentrasjonen, og dermed øke aerob arbeidskapasitet (2, 12). Erythropoietin (EPO) er et glykoproteinhormon som produseres i nyrenes parenkymceller og i makrofager hos voksne mennesker, mens rhEPO produseres i ovariene til kinesiske hamstere (11). EPO stimulerer kroppens produksjon, proliferasjon og modning av røde blodcellers progenitorceller i beinmargen (23).

I 1990 ble rhEPO, dets analoger og maskeringsagenter (som plasmaekspandere ol.) satt på Den internasjonale olympiske komité (IOC) liste over forbudte stimulerende stoffer (11), nå World Anti-Doping Agency's (WADA) List of Prohibited Substances (20). På dette tidspunktet fantes det ennå ingen test for å avsløre EPO-bruk hos idrettsutøvere.

Enkelte idrettsforbund som Det internasjonale skiforbundet (FIS) og Det internasjonale sykkelforbundet (UCI) innførte såkalte helsetester hvor de målte utøvernes hemoglobinkonsentrasjon (FIS) og hematokrittverdi (UCI) (6, 16). Dersom utøvere innen UCI måler $hct > 50\%$ blir de nektet start. Hos FIS var grensen initialt $Hb = 18,5\text{ g/dl}$, men er senere redusert til $17,0\text{ g/dl}$. Verdier over denne grensen betyr at utøveren ikke får lov til å starte i konkurransen. Helsetesten hadde til formål å redusere risikoen hos utøvere med høy hematokrittverdi -og dermed økt blodviskositet - å starte, da dette presenterer en helserisiko. Helsetestene kunne ikke brukes til å påvise dopingbruk hos utøverne, da hematokrittverdien kan påvirkes av mange faktorer som dehydrering, kroppsstilling, genetiske faktorer med mer.

RhEPO er til forveksling lik endogent EPO, og det var umulig å bevise bruk av dette med eksisterende laboratorieundersøkelser (2). Det at de er produsert av forskjellige arter gjorde at mye forskningsaktivitet ble rettet mot å påvise evt. strukturelle forskjeller mellom den humane og rekombinante formen. Skibeli et al. (15) viste at det er glykosyleringen som skiller rhEPO fra de naturlige isoformene. De konkluderte med at denne forskjellen kunne være avgjørende for å utvikle en direkte test for påvisning av av rhEPO-bruk i idrett.

Utover på 1990-tallet ble det forsket både på en indirekte og en direkte metode til å avsløre kunstig EPO-bruk hos idrettsutøvere. En indirekte metode baserer seg på å oppdage følger av bruk av kunstig EPO. Det er gjort flere undersøkelser på dette og flere parametre er fulgt, bl.a.

løselig transferrinreseptor (sTfR) i plasma eller serum, total EPO, hematokritt, retikulocytindeks og makrocytter (6). Det eneste parameteret som kunne brukes til påvise bruk av rhEPO var hypokrome makrocytter som følge av funksjonell jernmangel (FID) etter økt erythropoiese (9). Likevel klarte man bare å avsløre 21 av 87 prøver med en cutoff-verdi på 0,6 %. Et viktig punkt var at ingen i den placebobehandlede kontrollgruppen hadde verdier over dette. Dette var likevel ikke nok for å påvise dopingbruk i henhold til IOC's regler om et stoff skal kunne påvises direkte (6). En direkte test påviser tilstedeværelse av stoffet og er nødvendig for å kunne klassifisere en prøve som positiv. Denne var først tilgjengelig ved de Olympiske Leker i Sydney, Australia i 2000 (2).

Den nye testen kombinerte en direkte analyse av EPO i urin med en indirekte metode hvor man målte ulike hematologiske parametere (2). Testen er senere blitt utviklet og dagens test er beskrevet av Lasne et al. (11). Det er denne prosedyren som er beskrevet i WADA Technical Document – TD2004EPO (7), og baserer seg på 4 trinn:

1. Prøveforberedelse:
 - i. Sentrifugal ultrafiltrasjon for å øke konsentrasjonen av rhEPO i analysematerialet, da nivået av EPO er fysiologisk lavt i urin og det ikke økes av gjentatte injeksjoner på 20 IU/kg. Gjøres ved ultrafiltrasjon gjennom en membran med MWCO på 30 kDa ved sentrifugering på 3570 RCF i 20°C i 20 minutter.
 - ii. Buffervasking av urinprøven.
 - iii. EPO beskyttes mot degradering med proteasehemmeren Pepstatin A.
2. Isoelectric Focusing (IEF):
 - i. Vanligvis i pH-område mellom 2 og 6 fordi dette er kompatibelt med både humant EPOs og rhEPOs isoelektriske punkt (pI) og skiller disse to fordi de har ulik elektrisk ladning som følge av forskjellig glykosylering (11).
3. Double Blotting (DB):
 - i. Ny teknikk for å kunne isolere EPO og påvise dette direkte.
 - ii. Utviklet for å omgå problemet med nonspesifikk binding av sekundære antistoffer under immunoblotting (25, 26). Prinsippet er å overføre det primære antistoffet adskilt fra blottingmembranen til DB-membranen, mens antigenet og interfererende proteiner blir igjen på blottingmembranen.
 - iii. Spesielt nyttig ved analyse av proteiner som finnes i små mengder i biologisk materiale (26), som EPO i urin.
4. Chemoluminescens deteksjon:
 - i. En peroxidase tilsettes og reagerer med antistoffet på DB-membranen. Peroxidasen generer lys, og dermed dannes et bilde som gir posisjonen og mengden av EPO i gelen etter IEF-separasjon.
 - ii. Tolkes både visuelt gjennom WADAs identifikasjonskriterier og gjennom densitometri via "AIDA 1D-Evaluation" software på data.

En nærmere beskrivelse av prosedyren og dennes fordele og begrensninger følger i oppgavens hoveddel. I tillegg skal jeg forsøke å besvare følgende spørsmål:

Kvalitetskrav til selve analysen. Kvalitetsparametere.

1. Presisjon
 - a. Presisjon for repeterte målinger, uttrykt som innen serie VK (repetisjonsbarhet) og langtids VK (reproduserbarhet)
2. Riktighet

- a. Hvor langt unna en sann verdi ligger gjennomsnittet av mange målinger?
3. Nøyaktighet
 - a. Hvor langt unna en sann verdi ligger ett enkelt prøvesvar?

Hva slags kritiske grenser skal det settes til disse tre kvalitetsmarkørene?

Testen (Bayesiansk statistikk)

1. Sensitivitet
2. Spesifisitet
3. Prevalens
4. Positiv prediktiv verdi
5. Negativ prediktiv verdi
6. Nøyaktighet
7. ROC-kurver og AUC dersom dette foreligger

Laboratorier

1. Akkreditering
 - a. Hva kreves for å kunne utføre analysene?
 - b. Hvordan opprettholdes denne tillatelsen?
2. Ringtester
 - a. Hvordan kvalitetssikres arbeidet ved de akkrediterte laboratoriene?

I tillegg skal jeg se på hva som kan gjøre antidopingarbeidet bedre og hvilke utfordringer som er mest aktuelle i den nærmeste fremtid.

2. Metode

Hensikten med oppgaven var å gjøre et litteraturstudium på hvordan EPO-bruk detekteres og undersøkes innen idretten. I tillegg skulle jeg se på hvor sikker testen er og dermed om man kan stole på resultatene som blir offentliggjort etter både positive og negative prøver. Jeg har brukt medisinske databaser som Medline, Cochrane og Tidsskrift for Norsk Legeforening under mine søk etter tilgjengelig litteratur. I tillegg har jeg brukt søkefunksjonen for nettsøk på Reference Manager. Via denne har jeg søkt på PubMed. Jeg har brukt enten UiO-nettet eller sittet på egen PC med hjemmeoppkobling til UiO og søkt i tidsskrifter via X-port. Denne søkebasen fant jeg under Bibliotek for medisin og helsefags hjemmeside på internett. Via denne har jeg søkt etter artikler i relevante hematologiske og idrettsmedisinske tidsskrifter. Jeg har også brukt hjemmesiden til World Anti-Doping Agency (WADA) for å skaffe meg oversikt over akkreditering og prosedyre ved gjennomføring av prøveanalysen. Her fant jeg også listen over forbudte stoffer innen idretten, hvor EPO, dets analoger og maskeringsmetoder er listet opp. Jeg har også benyttet Rang et al.: Pharmacology (23) for å lese om bruk av EPO i medisinsk sammenheng, og Evensen et al.: Blodsykdommer (24) for repetisjon av erythropoiesen.

Alle søkene har inneholdt ordet EPO eller erythropoietin. Av tilleggsord som er brukt er reference values, athletes, sports, detection, false positives, false negatives, statistics og doping. Avgrensning er gjort ved bruk av AND eller OR og et eller flere av tilleggsordene. Videre avgrensning er gjort ved å velge ut artikler med relevans for arbeid innen idrett. Jeg har valgt bort en del artikler som omhandler behandling med og måling av EPO hos syke pasienter. Da dette er et felt som har vært i sterk utvikling de siste 10-15 årene, og fordi en effektiv test kun har vært tilgjengelig i 7 år, har jeg valgt å fokusere på artikler publisert etter år 2000 for å få mest mulig oppdatert kunnskap. Et siste inklusjonskriterium var at artiklene måtte være enten på norsk eller engelsk, og gjerne relatert til utholdenshetsidrett.

Etter bruk av inklusjonskriteriene nevnt over, valgte jeg ut artikler jeg vurderte som relevante og interessante for oppgaven. Jeg gikk inn i fulltekst-utgavene der de var tilgjengelig (alle unntatt (12)), og brukte funksjonen for "related articles" for å finne andre artikler innenfor samme tema. Det ble en blanding av originalartikler og review-artikler, i tillegg til noen kommentarer og lederartikler. De siste er brukt som historisk bakgrunnsinformasjon, og ikke til tolkning eller informasjon om resultater. Review-artiklene er brukt til å danne seg en oversikt over temaet og hva som finnes av relevant forskning innenfor fagfeltet. Jeg har benyttet meg av originalartikler der dette har vært nødvendig for å få mest mulig sikre resultater, fra kilder jeg vurderer som relevante og fra anerkjente forskningsmiljøer. Disse er benyttet for å få et mest mulig riktig bilde av resultatene etter forskjellige forsøk, og slik at man kan tolke resultatene direkte fra originalartiklene.

3. Resultater

3.1 EPO – egenskaper, struktur og isoformer:

EPO er glykoprotein-hormon som består av 165 aminosyrer og har en molekylvekt på 34 kDa (8). Det syntetiseres som kjent i nyrenes parenkymceller som en respons på lav oksygenering i blodet. EPO er en hovedfaktor for proliferasjon av erythrocytter i menneskekroppen, ved å stimulere erythrocyttenes progenitorceller etter delingen av pluripotente hematologiske stamceller i beinmargen (23) og tidlig frigjøring av unge retikulocytter fra beinmargen (5). Karbohydratinnholdet er ca. 40 % (8). Glykosyleringen av EPO er kritisk for biologisk aktivitet (8), og er der den avgjørende strukturelle forskjellen ligger mellom endogent EPO og de ulike rekombinante hormonene (11).

RhEPO er en rekombinant form av det naturlig forekommende EPO-molekylet. Molekylvekten er 30 kDa og inneholder omtrent 39 % karbohydrat (5). Aminosyresekvensene for endogent EPO og rhEPO viser at disse i stor grad er bevart og at de dermed er forholdsvis like strukturelt. Glykosyleringen er imidlertid forskjellig (8, 15), da denne er arts- og vevsspesifikk (8). Skibeli et al (15) rapporterer at den viktigste forskjellen mellom humant EPO og rhEPO er mangel av tetra-sylrige oligosakkaridstrukturer i humant EPO i serum.

Det finnes flere typer av rhEPO, hvor epoietin alfa og epoietin beta er de mest brukte. Disse er klinisk udistinkte. I tillegg finnes Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP, Darbepoietin α) som skiller seg fra humant EPO med 5 aminosyrer (18). NESP binder seg til EPO-reseptoren og induserer intracellulær aksjon som det originale EPO-molekylet. Den største forskjellen klinisk er at NESP har lengre halveringstid i blod enn andre EPO-analoger og økt biologisk aktivitet in vivo.

I utholdenhetsidretter er blodets evne til å frakte oksygen den største begrensende faktoren, og gevinsten er spesielt stor i idretter hvor det er mindre forskjeller i utstyr og teknikk. Bruk av EPO og NESP øker den aerobe ytelsesevnen ved at oksygenopptaket og blodets evne til å frakte oksygen øker (5). Det er også postulert at EPO-bruk kan redusere laktatopphopning i kroppen, men her finnes det ikke konkluderende bevis (27).

Administrasjon av rhEPO kan foregå enten intravenøst (IV) eller subcutan (SC) (5), hvor IV-injeksjon gir en raskere stigning i plasma og kortere deteksjonstid i serum (2-3 dager vs. 4 dager ved SC-injeksjon). De fleste studier er gjort ved subcutan administrasjon av rhEPO eller NESP.

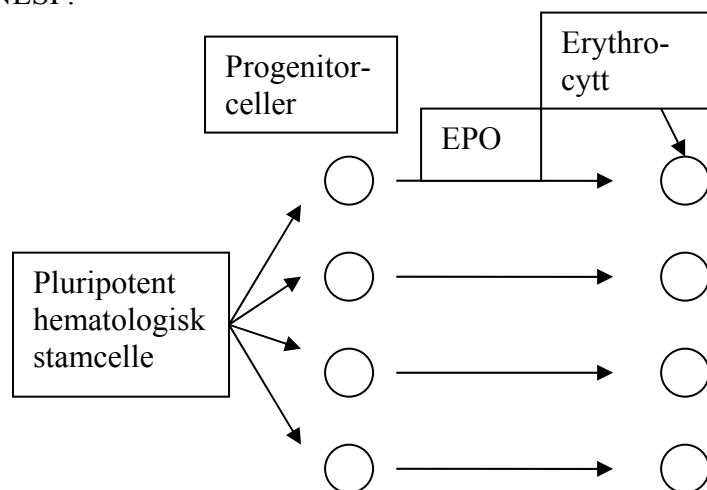


Fig. 1:
Skjematisk fremstilling av erythropoiesen og erythropoietins virkningssted i denne prosessen.

Fritt etter Rang et al (23).

3.2 Deteksjon av EPO-bruk hos idrettsutøvere:

RhEPO og dets like har stått på listen over forbudte stimulerende stoffer siden 1990 (20), men en effektiv test var ikke tilgjengelig før under de Olympiske Leker i Sydney i 2000 (2). Under disse 10 årene var det ikke mulig å avsløre bruk av rhEPO, men enkelte strategier ble utarbeidet for å mistenke bruk, bl.a. å suspendere utøvere med for høy hematokritt eller hemoglobin gjennom de såkalte helsetestene (nevnt i innledningen). Dette er typiske eksempler på indirekte metoder.

3.2.1 Indirekte metoder:

Indirekte metoder krever at man analyserer parametere enten i fullblod eller serum hos utøverne, og disse metodene er fortsatt aktuelle som screening. En direkte test er kostbar og tidkrevende og ikke nødvendig å utføre uten mistanke. Flere parametere ble fulgt og undersøkt for å se om de viste forandringer under administrasjon av kroppsfremmed EPO (5). Man så blant annet på hematokritt (hct), hemoglobin (Hb), total EPO, retikulocytter (ret), hypokrome makrocytter og løselig transferrinreseptor (sTfR) (5, 10). Da det kan være store både interindividuelle og intraindividuelle forskjeller som alder, kjønn, kroppsvekt, blodvolum og hydreringsstatus knyttet til disse verdiene ga ingen, verken alene eller i kombinasjon med andre, et fullstendig bevis for om det var benyttet rhEPO.

Videre forskning ledet til at det ble utarbeidet matematiske modeller for å avsløre tegn på endret erythropoiese (10). Man tok i bruk flere av parametrene for å øke spesifisiteten og redusere risikoen for falsk positive. Dette er såkalte ON- og OFF-modeller, hvor ON er en formel for påvisning under EPO-administrasjon, mens OFF er for påvisning etter avsluttet EPO-behandling. Det viste seg at OFF-modellen er den mest sensitive mht. bruk av rhEPO, og UCI bruker denne modellen for å følge utviklingen av blodparametre hos enkelte utøvere. Det har vært utarbeidet flere matematiske formler for disse modellene. Formelen til Morkeberg et al (38) er den i dag mest aktuelle:

$$\text{OFF} = [\text{Hb}] \text{ (g/L)} - 60(\text{g/L})\sqrt{(\% \text{ret})}$$

Følgende cut-off-verdier har man kommet frem til:

	Menn (g/L)	Kvinner (g/L)
1:10 falsk positive	$\geq 104,6$	$\geq 92,2$
1:100 falsk positive	$\geq 116,7$	$\geq 104,4$
1:1000 falsk positive	$\geq 125,6$	$\geq 113,5$

Da det kan være store individuelle forskjeller mellom ulike individer er det også utviklet en formel for å regne på grad av endring mellom flere prøver av samme utøver:

$$\text{OFF z-score} = (\text{OFF}_{\text{nå}} - \text{OFF}_{\text{gj.snitt}}) / \sqrt{(\sigma^2(1+1/n))},$$

hvor σ^2 er variansen mellom målinger fra utøveren og n er antall prøver fra utøveren tatt før den aktuelle målingen. En tilsvarende formel finnes for [Hb], og har de samme Cut-off-verdiene.

Cut-off-verdier her er:

1:50 falsk positive	$\geq 2,33$ (uten benevning)
1:1000 falsk positive	$\geq 3,09$ (uten benevning)

Det er konkludert med at endringer og verdier som overstiger dette gir stor grad av mistanke om bruk av rhEPO eller NESP.

Parisotto et al (16) offentliggjorde i år 2000 en artikkel hvor de så på retikulocyttparametere som mulig tegn på EPO-bruk hos eliteutøvere. Her gjorde de et forsøk hvor en de sammenliknet blodbildet hos en gruppe som gjennomførte naturlig høydetrening, en gruppe som ble utsatt for simulert høydeopphold og en gruppe som ble behandlet med EPO. De konkluderte med at absolutt retikulocyttall er den kraftigste diskriminatoren for bruk av EPO. Dette tallet tredoblet seg 1-2 dager etter injeksjon av 1200 U/kg over en 10-dagersperiode. Disse forandringene var over dobbelt så store som endringene assosiert med naturlig høydepåvirkning, mens simulert høydepåvirkning ikke viste noen signifikant endring i retikulocyttparametere. Sannsynligheten for å oppdage bruk av rhEPO etter denne modellen er avhengig av hvor man setter cutoff-punktet for absolutt retikulocyttall. Med en cutoff-grense på $221 \cdot 10^9/L$ vil man identifisere minst 38 % av brukerne med antall falsk positive = 7/100 000.

Allerede i 1993, kun få år etter EPOs inntreden på det kommersielle markedet, offentliggjorde Casoni et al. (9) en studie hvor de sammenliknet blodverdiene hos 20 frivillige idrettsutøvere som hadde gjennomgått rhEPO-behandling med verdier funnet hos 240 eliteutøvere. Verdiene som ble studert var hemoglobin, hematokritt, retikulocyttall og makrocytter. De konkluderte med at det eneste parameteret som kunne brukes til å mistenke bruk av rhEPO var hypokrome makrocytter som følge av funksjonell jernmangel (FID) grunnet akselerert erythropoiese.

3.2.2 Direkte metoder:

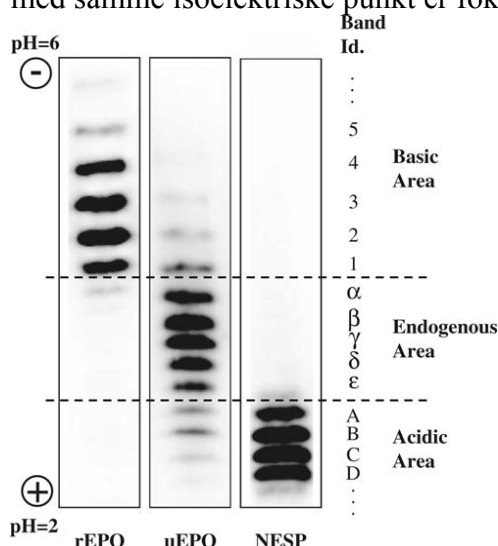
Selv om rhEPO, NESP og originalt humant EPO viser stor grad av likhet med tanke på aminosyrestruktur, er det visse forskjeller i glykosyleringen. Det fører til at det blir en forskjell i elektrisk ladning mellom molekylerne, og dette utnyttes for å påvise dem direkte i urinprøver fra idrettsutøvere (10, 11). Mens en ved innføringen av effektive tester for rhEPO ved de Olympiske Leker i Sydney i 2000 måtte basere seg på kombinasjonen av en indirekte test av blodet og en direkte test av urin, er det senere utviklet en direkte test for påvisning av kroppsfremmed EPO og NESP i urin alene. Denne prosedyren er beskrevet av Lasne et al. (11) i 2002, og har dannet grunnlaget for utarbeidelsen av en standardisert prosedyre for gjennomføring av analysen (7).

Det var spesielt tre utfordringer som måtte løses før en klar og pålitelig test var tilgjengelig:

1. Nivået av EPO er fysiologisk lavt i urin og økes ikke av gjentatte injeksjoner på 20 IU/kg (11). Derfor må urinen konsentreres. Dette oppnås ved ultrafiltrasjon gjennom en membran med MWCO på 30 kDa. Ingen passasje av EPO gjennom membranen ble observert selv om hormonet molekylvekt er 34 kDa. Det er ikke rapportert om årsaken til dette, men en mulig forklaring kan være ladnings- og/eller glukosyleringsegenskaper hos EPO-molekylet.
2. En sterk tendens til nonspesifikk binding av proteinene i urin til sekundære antistoffer ble observert etter klassisk immunoblotting, slik at EPOs isoformer ble maskert av andre proteiner (11). Double blotting-prosedyren (25) var essensiell for å hindre uinteressante proteiner i urin til å forstyrre påvisningen av EPO fordi denne omgår problemet med nonspesifikk binding da man overfører antigenet til DB-membranen og de interfererende proteinene og antistoffet blir værende igjen på blottingmembranen.
3. Etter at problemet med nonspesifikk binding var løst, oppdaget man intet EPO ved Isoelectric Focusing (IEF) (11), selv om man hadde nødvendige nivåer av hormonet. Det ble postulert at EPO ble degradert ved gjennomføringen av IEF, og man fant det nødvendig å beskytte EPO med proteasehemmere som pepstatin (7, 11). Det var tilstrekkelig for å hindre degradering av EPO. I tillegg skal den konsentrerte urinen varmebehandles på 80°C i 3 minutter før gjennomføring av IEF, da dette er en meget

effektiv måte å beskytte EPO på, da EPO har høy stabilitet selv i høye temperaturer (11). Varmerbehandlingen er en effektiv beskyttende prosess mot EPO-degradering ved at proteasene denatureres, og rhEPOs isoelektriske punkt påvirkes ikke av denne behandlingen.

Standardprosedyren for gjennomføring av testen er utarbeidet av Lasne et al (11). Første steg er konsentrasjon av urinen fra 20 ml til 50 µl grunnet lav fysiologisk konsentrasjon av EPO i urin. Urinen analyseres deretter ved Isoelectric Focusing (IEF) som separerer de ulike glykosyleringsformene på en gel. Proteinene overføres til en membran og gjenkjennes av et monoklonalt antistoff som er spesifikt for EPO (et mus-antihumant EPO antistoff – AE7A5, R&D systems, Oxford, UK (40)), den såkalte Double Blotting (DB)-metoden (25, 26). Proteinene detekteres med bruk av et substrat som gir chemoluminescens og lyssignalet leses av et ladningskoblet kamera, som måler intensiteten av de ulike glykosyleringsformene. Intensiteten representerer mengden av protein som er overført til membranen. Minimumskonsentrasjonen av EPO som må være tilstede i urin for at det skal kunne detekteres er 0,4 IU/l (11). Sluttresultatet blir et bilde som viser bånd hvor grupper av EPO med samme isoelektriske punkt er fokusert.



Dette bildet kommer frem av ladningsforskjellen mellom endogent EPO og de rekombinante formene. Bildet tolkes med et ladningskoblet kamera som måler intensiteten til EPO-båndene og tolkes via programvare på data (11). I 2005 publiserte en østerriksk forskningsgruppe et WADA-støttet prosjekt (35) hvor det ble anbefalt at man benytter programvaren GASepo i analysearbeidet. Dette for å standardisere prosedyren verden over, og dermed få sikrere resultater. Ut fra dette kan WADAs positivitetskriterier brukes.

3.2.3 Positivitetskriterier for rhEPO i urin (7):

1. Det må være minimum 3 sammenhengende bånd nummerert som 1, 2, 3 eller 4 i referanseprøven.
2. De 2 sterkeste båndene, målt enten med densitometri eller bedømt visuelt i det basiske området, må være sammenhengende og det mest intense båndet må være enten 1, 2 eller 3.
3. De to mest intense båndene i det basiske området må være mer intense enn alle andre bånd i det endogene området, målt enten med densitometri eller bedømt visuelt.

3.2.4 Positivitetskriterier for NESP i urin (7):

1. Det må være minst 3 sammenhengende bånd navngitt som B, C og D i det acidotiske området.
2. Det mest intense båndet må være enten C eller D, målt ved densitometri eller bedømt visuelt.
3. Det mest intense båndet må være mer intenst enn alle bånd i det endogene området.

3.3 Deteksjonsvindu for Epoietin α , Epoietin β og Darbepoetin α :

Lamon et al. (18) publiserte i 2007 en studie som viser at deteksjonsvinduet kun er 3 dager etter en enkelt dose (4000 IU) rhEPO, mens deteksjonsvinduet for Darbepoetin α er minimum 7 dager etter en dose på 4760 IU NESP. Dette sammenfaller med de ulike halveringstidene for de forskjellige formene, hvor Darbepoetin α har lengre halveringstid i serum enn epoietin α og epoietin β . Innenfor disse grensene oppdaget de alle som hadde brukt stoffet, etter bruk av WADAs positivitetskriterier. Disse resultatene støttes av Morkeberg et al (39) som fant tilsvarende resultater ved lavere og hyppigere dosering.

Det skal legges til i forhold til deteksjonsvinduet at tiden for prestasjonsforbedring varer i minst 3 uker etter siste administrasjon av medikamentet (6), så det er mulig for en utøver å ha forbedrete resultater som følge av bruk av rhEPO, selv om han/hun skulle avlegge en negativ prøve.

3.4 Akkreditering:

Det er i dag 34 laboratorier som er godkjent for dopingkontroll og – analyser av World Anti-Doping Agency (WADA). I Norge er Hormonlaboratoriet ved Aker Universitetssykehus eneste akkrediterte institusjon. De 33 andre laboratoriene ligger spredt over hele verden (21). For å bli godkjent av WADA må en rekke kriterier oppfylles og man må gjennom en krevende kontroll- og søknadsprosess. Prosessen innebærer følgende (28):

- ISO/IEC 17025
 - Laboratoriet må oppfylle kriteriene her før WADA-akkreditering kan oppnås.
 - Gjøres av en nasjonal kvalitetskontrollmyndighet.
 - Innebærer en rekke krav vedr. dokumentasjon, kontroll og kalibrering av utstyr, og deltakelse i et sentralt kontrollprogram.
- Anbefalingsbrev
 - Laboratoriet må ha en skriftlig bekreftelse fra den nasjonale olympiske komité eller den nasjonale anti-dopingmyndigheten.
 - Her skal det gå bekreftes at laboratoriet har den nødvendige finansielle støtte og mulighet til å gjennomføre det nødvendige antall tester i den nærmeste 3-årsperioden.
- Etiske regler
 - Må oppfylle og signere de etiske bestemmelsene angitt i WADAs standard for laboratorier (28).
- Godkjennende testing
 - Under godkjennelsesperioden må laboratoriet analysere minimum 4 sett med minst 5 prøver pr. sett med korrekt resultat. Minimum 4 av disse vil inneholde forbudte stoffer, men også forandrete prøver kan forekomme.
- Deling av kunnskap
 - Laboratoriet skal under godkjennelsesperioden vise at de kan og vil dele kunnskap med andre WADA-akkrediterte laboratorier.
- Forskning

- Minimum 7 % av budsjettet skal være dedikert forskning og utviklingsaktiviteter i forbindelse med dopingkontroll.

Denne kontrollperioden tar vanligvis mellom 12 og 24 måneder (28), og etter dette kan laboratoriet bli anbefalt for godkjenning dersom de oppfyller kravene på en tilfredsstillende måte. Dersom laboratoriet under denne perioden har falsk positive resultater, identifiserer under 90 % av kontrollprøvene riktig eller har for stor usikkerhet i kvantitative analyser ($z\text{-score} > 3$) blir de ikke godkjent (28). Z-score er et mål for variasjon ved kvantitative undersøkelser, og regnes ut etter formelen (28):

$$Z = \frac{X - \text{målverdi}}{\delta}$$

hvor X er den målte verdien, målverdi er en gitt verdi for undersøkelsen og δ er en målverdi for standardavvik. Et tall på mellom 2 og 3 defineres som tvilsomt, mens over 3 er uakseptabelt.

For å opprettholde akkrediteringen er et kontrollsystem utviklet slik at man kan kontrollere at de godkjente laboratoriene opererer med nødvendig grad av sikkerhet. De viktigste punktene her er (28):

- Nytt godkjennelsesbrev i år hvor laboratoriet reakkrediteres gjennom ISO 17025-kravene.
- Dokumentere antall årlige tester
 - Minimum 1500 pr. år.
- Dokumentere etterlevelse av de etiske bestemmelsene
- Dokumentere forskningsaktivitet
- Delta i WADA/ISO periodiske reakkrediteringsundersøkelser
 - Laboratoriet skal utfordres med minimum 5 kontrollprøver hvert kvartal.
 - Årlig vil det være minimum to med terskelverdi-substanser.

Kriteriene som stilles er de samme som under godkjennelsesperioden, men man har noen tilleggsrettigheter. Bl.a. har de godkjente laboratoriene rett til å forklare seg dersom de har kommet frem til et falskt positivt resultat og mulighet til å utbedre forholdene som førte til dette.

3.5 Statistiske overveielser:

Breidbach et al (17) utførte i 2003 en blindet studie hvor de behandlet en gruppe på 14 personer med epoietin α og 10 personer i en placebobehandlet gruppe. I tillegg var det en kontrollgruppe på 96 personer som ikke fikk noen av delene. De som fikk EPO fikk dette 9 ganger over en periode på 18 dager i en dose på 50 IU/kg pr gang. Målet var både å bestemme deteksjonsvinduet for epoietin α og finne ut hvor stor andel av de EPO-behandlede som kunne identifiseres på forskjellige tidspunkt både under administrasjon og etter seponering av medikamentet. Studien ble utført ved å benytte tidligere beskrevet teknikk for påvisning av EPO i urin (11) og ved å benytte en liknende klassifisering som WADAs positivitetskriterier. Prøvene ble sendt til 4 erfarne lesere for analyse og fastsettelse av om prøven inneholdt rhEPO eller ikke.

Resultatene viste at alle i placebogruppen ble plassert riktig både 3 dager etter seponering og 7 dager etter seponering av placebo. Dette gjaldt både ved manuell lesing av bildet etter IEF og etter dataanalyse ved densitometri. For gruppen behandlet med rhEPO ble alle prøver 3

dager etter seponering korrekt plassert som brukere av rhEPO, mens etter 7 dager kunne man bare klassifisere 7 av 14 som positive ved densitometri. De manuelle leserne plasserte mellom 6 og 11 individer korrekt som brukere.

Det konkluderes med at resultatene er sammenliknbare med Lasne et al (11) resultater, og at metoden er adekvat for deteksjon av rhEPO i urin. I tillegg noteres det at man ser tegn på at endogen EPO-produksjon går ned som følge av bruk av rhEPO, da endogent EPO nesten ikke kan påvises i det hele tatt. Dette er også et viktig punkt ved tolkningen av analyseresultatene.

3.5.1 Presisjon:

Når det gjelder begrepene repeterbarhet og reproducerbarhet er det vanskelig å finne gode verdier for dette i litteraturen, men det må nevnes at det i kontrollerte studier ikke er dukket opp noen tilfeller av falskt positive analyser.

3.5.2 Nøyaktighet:

Flere uavhengige studier bekrefter hverandres resultater både ved undersøkelse for epoietin α og β (11, 17) og darbepoetin α (18, 39). Det er rapportert at EPO-profilen etter hard fysisk anstrengelse kan forskyves noe mot basisk pH (19, 29), men dersom påvisningskriteriene appliseres på rett måte skal disse profilene likevel med stor sikkerhet klassifiseres som negative (31).

3.5.3 Sensitivitet:

Sensitiviteten til testen for rhEPO og NESP i urin gis av Morkeberg et al (39) til 96 % for bruk av metoden 2-3 dager etter administrasjon av darbepoetin α . Etter 10 dager er denne sunket til 67 %. Liknende tall finnes for rhEPO, men da etter henholdsvis 3 og 7 dager (17, 39).

3.5.4 Spesifisitet:

Da det ikke er rapportert om falsk positive kan vi gå ut fra at spesifisiteten også er høy, men denne er ikke tallfestet.

3.5.5 Prevalens:

Prevalensen er vanskelig å si noe om, og varierer sannsynligvis stort fra idrett til idrett. Azzazy et al (8) rapporterer at doping med rhEPO sannsynligvis brukes av 3-7 % av de beste utøverne i utholdenhetsidrett. At prevalensen sannsynligvis er høyere hos de beste utøverne indikeres også av Morkeberg et al (39) ved at 50 % av medaljevinnerne under VM på ski i Lahti 2001 hadde unormalt høy hemoglobinkonsentrasjon, mens det gjaldt bare 3 % av dem på plassene mellom 41 og 51.

3.5.6 Positiv og negativ prediktiv verdi:

Ved hjelp Solberg og Mørkrid (41) kan vi utlede formlene under og regne ut positiv (PPV) og negativ (NPV) prediktiv verdi. Formlene er som følger:

- $$PPV = \frac{\text{Sensitivitet} * \text{Prevalens}}{\text{Sensitivitet} * \text{Prevalens} + (1 - \text{Spesifisitet})(1 - \text{Prevalens})}$$
- $$NPV = \frac{\text{Spesifisitet}(1 - \text{Prevalens})}{\text{Spesifisitet}(1 - \text{Prevalens}) + (1 - \text{Sensitivitet})(\text{Prevalens})}$$

Vi har sensitivitet = 0,96 og setter spesifisitet = 0,98 (høy) for regneeksempelet.
Prevalensnivåer er gitt i tabellen under.

Prevalens (%)	Positiv Prediktiv Verdi (PPV)	Negativ Prediktiv Verdi (NPV)
1	0,327	0,999
5	0,716	0,998
10	0,842	0,995
25	0,941	0,987
50	0,98	0,961
90	0,998	0,731

Vi ser at resultatene for positiv test er sikrere ved høyere prevalensnivåer. Det er derfor en fordel med en indirekte screening før gjennomføring av det direkte testen. Det er også dette som gjøres i praksis.

4. Diskusjon

4.1 Nåværende utfordringer:

Vi ser at deteksjonsvinduet for rhEPO og NESP i urin er mye kortere enn varigheten av prestasjonsforbedringen. De kan være flere forklaringer til dette. Erythropoiesen er en prosess hvor det tar noe tid fra cellene utvikler seg fra stamcellestadiet til de er fullt modne erythrocytter, det er en viss "treghet" i utviklingen. Dermed må erythropoiesen være akselerert i noen dager før man ser en økning av erythrocytter. I tillegg er levetiden til røde blodceller ca. 120 dager, derfor lever cellene som er dannet under akselerert erythropoiese lenge etter at den stimulerende effekten er borte.

Her ligger en stor utfordring i forhold til antidopingarbeid i fremtiden. Det er utarbeidet flere strategier for å forbedre dette arbeidet og øke sannsynligheten for å avsløre de som fristes til å jukse. Kazlauskas et al. (6) setter opp en interessant fremgangsmåte for å øke deteksjonsgraden av ulovlig bruk av rhEPO. Av dette følger bl.a.:

- Det må testes uanmeldt utenfor konkurranse og i treningsperioder.
- Det bør i tillegg til urinprøve tas en blodprøve hvor man følger endringer i Hb, Hct, reticulocytter og EPO, samtidig med at det utarbeides såkalte blodpass for hver enkelt utøver.
- Man bør ta hensyn til utøvernes konkurransekalender under utvelgelsen av hvem man skal teste utenfor konkurranser.
- Utøvere med Hb- eller hct-verdier utenfor referanseområdet bør testes med laboratoriebaserte tester for avsløre bruk av rhEPO, NESP og deres maskeringsmetoder.
- Mistenkelige resultater bør lagres i en sentral database.

Dette er fornuftige punkter. I tillegg må det såkalte meldesystemet for eliteutøvere kommenteres. Alle eliteidrettsutøvere i olympiske idretter er pliktig å fylle ut en detaljert plan for hvor de vil befinne seg de nærmeste 3 måneder, og er også pliktig til å melde endringer dersom dette skulle inntreffe (36). Dersom utøveren ikke er på angitt sted når dopingjegeren dukker opp, regnes dette som et avvik. Dersom dette skjer 3 ganger, kan utøveren utestenges, jmf. Rasmussen-saken i fjorårets Tour De France. Det er kommet flere klager mot dette systemet, bl.a. at det oppleves som utilbørlig overvåkning og at det ikke alltid er like lett å vite hvor man befinner seg noen uker eller måneder frem i tid. I tillegg kan man tenke seg at enkelte utøvere som har til hensikt å bruke stimulerende midler bevisst rapporterer feil oppholdsadresse, slik at de ikke blir funnet av kontrollørene. De kan i prinsippet gjøre dette 2 ganger, da det først får konsekvenser ved det tredje tilfellet.

Når det gjelder lagring av mistenkelige resultater i en sentral database oppstår det enkelte problemer i forhold til etikk og datatilsyn. Man kan argumentere for at gå på personsikkerheten løs, og at dette er å anse som unødvendig overvåkning. Derfor er det nødvendig å innhente samtykke fra utøverne før noe slikt kan iverksettes. Dette gjøres allerede i flere idretter.

Det viktigste punktet i oversikten er likevel at det må testes uanmeldt i treningsperioder. Da påvisningsvinduet for EPO er såpass kort, er det nødvendig å teste under aktiv administrasjon av medikamentet. Det er velkjent at utøvere kan benytte seg av ulovlige midler under treningsperiodene, for deretter å møte opp til konkurranser når stoffet ikke lenger er mulig å påvise i urin eller blod.

Det er også flere begrensninger forbundet med analysen av kroppsfremmed EPO i urin fra idrettsutøvere, og flere potensielle feilkilder. For det første varierer proteinkonsentrasjonen i urin mellom hver gang man urinerer. Selv om Lamon et al. (18) konkluderte med at deteksjonsvinduet for Darbepoetin α i urin er 7 dager etter en dose med 4760 IU NESP etter bruk av WADAs positivitetskriterier, opplevde de at de i enkelte prøver godt innenfor deteksjonsvinduet ikke kunne påvise tilstedeværelse av NESP. Det samme skjedde under studien til Breidbach et al (17) hvor 2 av 48 prøver viste ikke påvisbar rhEPO selv om man befant seg godt innenfor deteksjonsvinduet. Årsaken til dette kommer trolig fra lav EPO-konsentrasjon i urin, og dette er notert som en viktig begrensning i analysearbeidet. Uoffisielle tall (18) viser at mellom 10 og 15 % av alle EPO-tester viser slike ikke påvisbare profiler.

I tillegg var det et problem i de første årene etter at testen ble tilgjengelig at man ikke hadde et standardisert verktøy for å måle intensiteten av EPO-båndene etter IEF. Dette ble bedret av Bajla et al (35) da de utviklet dataprogrammet GASepo som er tilgjengelig for alle WADA-akkrediterte laboratorier, og som også er anbefalt av WADA. Dette programmet måler intensiteten av EPO-båndene etter at man har lagt til et bilde tatt med digitalkamera som er koblet til programmet. Det gir en skjematisk og tallmessig oversikt over hvor sterk intensiteten er, og man kan ut fra dette bruke det opp mot WADAs positivitetskriterier.

Et viktig problem som har vært heftig diskutert er muligheten for falsk positive prøver grunnet proteinuri etter hard fysisk anstrengelse. Beullens et al (19) påviste denne muligheten i 2006, og dette ble gjenstand for diskusjon mellom flere forskningsmiljøer (30, 31, 32) over hvorvidt WADAs positivitetskriterier var riktig brukt og om kvaliteten på bildet etter IEF. Delanghe et al (37) konkluderer med at problemet med proteinuri etter anstrengelse kan løses med urinprøve enten før eller mer enn 1 time etter konkurranse eller hard trening, og at årsaken til et falskt positivt resultat er at antistoffet som brukes under analysen kan reagere med andre proteiner i urin i tillegg til EPO. Dette øker også behovet for en standardisert prosedyre slik at ingen blir uskyldig dømt.

Ifølge WADAs akkrediteringsbestemmelser (28) vil et laboratorium som analyser en negativ kontrollprøve som positiv, bli suspendert eller miste sin akkreditering. Selv om dette problemet er annerledes enn problemet med proteinuri etter anstrengelse belyser det problematikken rundt falsk positive resultater. En utøver som feilaktig blir beskyldt for å ha benyttet seg av ulovlige metoder vil uansett resultat av etterundersøkelser ha redusert troverdighet både blant konkurrenter og publikum. Derfor må påvisningsgrensene for en rekke ulike dopingmidler settes såpass høyt at falsk positive prøver blir redusert til et absolutt minimum. Det kreves også nøye kontroll av utstyret som benyttes til analysene.

Prosedyren med å påvise rhEPO i urin og både dyr og tidkrevende. I tillegg er påvisningsvinduet for EPO og NESP i urin meget kort. Derfor har det ingen hensikt å utføre denne analysen ved alle urinprøver fra idrettsutøvere. En målrettet innsats er nødvendig for å øke sannsynligheten for å avsløre de som virkelig jukser. Dette gjøres ved å følge opp utøvere med blodtester som måler blodverdier som hemoglobin og retikulocytter spesielt, og å benytte seg av OFF-modellen og kanskje spesielt OFF z-score for å bedre kartlegge endringer for samme individ. Cut-off-verdiene her gir gode holdepunkter for at det har vært benyttet blodmanipulerende metoder som rhEPO, NESP eller regulære transfusjoner.

Prevalenstallene til Azzazy et al (8) er bare en anslått verdi og dermed høyst usikre. For å få et mest mulig riktig bilde av testen ser vi regneeksempelet i resultatdelen at det er en fordel med en screening i forkant av selve testen for rhEPO i urin. Hvis man kun tester utøvere med OFF z-score over Cut-off-nivået har man trolig en mye høyere prevalens enn 3-7 %. Med tanke på at testen også er dyr og tidkrevende, er det fornuftig å bruke ressursene der man har størst mulighet for å avsløre ulovlig bruk. Det er også en slik fremgangsmåte man benytter seg av i praksis. Man overvåker ofte blodverdiene til enkelte utøvere over tid for så å prøve å slå til når sannsynligheten for bruk er størst. Ideelt sett burde jeg også hatt en sikker verdi for spesifisitet ved dette regneeksempelet, men dette har jeg ikke kunnet få frem i løpet av min arbeidsperiode.

4.2 Fremtidige utfordringer:

EPO er en moderne form for bloddoping, men med introduksjon av effektive tester og systemer for å avsløre jukserne, er også tradisjonell bloddoping ved transfusjoner igjen blitt mer vanlig. I tillegg kommer det stadig til nye metoder utviklet gjennom medisinske fremskritt. Azzazy et al. (8) forteller om muligheter for prestasjonsforbedring gjennom bruk av hGH (humane veksthormoner), insulinliknende vekstfaktor-1 (IGF-1) og andre metoder, deriblant såkalt gendoping. Problemet med slik manipulasjon er ikke bare at det er juks og lite rettferdig overfor konkurrentene, men det kan også skade utøverens helse og i ytterste konsekvens være livstruende. Såkalte hypoksiske induserbare faktorer (HIF) nevnes også (8, 33). Disse kan endre transkripsjon av gener som koder for bl.a. EPO og dermed øke aerobisk prestasjonsevne, men kan også stimulere gener som koder for molekyler involvert i celledeling og – deling, og dermed føre til kreftsykdom. Dessuten nevner WADA (27) muligheten for doping med såkalte syntetiske oksygenbærere. Bruk av disse kan riktignok avsløres (27), men bruk er en risikofaktor for kardiovaskulære hendelser.

Utfordringen er dermed 3-delt:

1. Man må utvikle gode og pålitelige tester for å avsløre bruk av ulovlige prestasjonsfremmende substanser, slik at risikoen for å bli avslørt er stor for utøveren. Dette kan føre til at det er flere som vurderer at risikoen for å bli tatt er for stor i forhold til gevinsten.
2. Man må utvikle og implementere et system slik at man kan teste utøvere i perioder det er mest sannsynlig å avsløre ulovlig bruk. Dette inkluderer tester utenfor konkurranse og å følge opp utøvere som tidligere har hatt avvikende prøver. Meldesystemet for eliteutøvere er viktig her. I tillegg bør straffene gjøres så strenge at karrieren kan gå tapt dersom man blir avslørt. I dag er vanlig straff etter avsløring av dopingmisbruk utestenging fra konkurranser og organisert idrett i 2 år.
3. Idrettsutøvere bør utdannes og undervises i hvilke skadevirkninger bruk av stimulerende substanser kan ha på fremtidig liv og helse, samtidig som det skader idrettens anseelse.

Samtidig må det kommenteres at en utøver som benytter seg av stimulerende midler sjelden opererer alene. Spesielt med de moderne og avanserte dopingmetodene vi ser i vår tid, er det overveiende sannsynlig at det store flertallet av jukserne får profesjonell hjelp. Derfor bør det være mulighet for også å straffe bakmenn og medhjelpere, inkludert helsepersonell som medvirker i slik virksomhet.

5. Referanser

- 1) Lereim I: Nasjonalt og internasjonalt antidopingarbeid. Tidsskr Nor Legeforen 2001; 121: 1563.
- 2) Sundar T: Ny test for bloddoping under Sydney-OL. Tidsskr Nor Legeforen 2000; 120: 2458.
- 3) DeFrancesco L: The faking of Champions. Nature Biotechnology 2004; 22: 1069-71.
- 4) Bolan BJ, Sandberg S. Evaluering av nye laboratorieanalyser. Tidsskr Nor Legeforen 2003; 123: 337-39.
- 5) Breymann C: Erythropoietin test methods. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism 2000; 14: 135-45.
- 6) Kazlauskas R, Howe C, Trout G: Strategies for rhEPO Detection in Sport. Clinical Journal of Sports Medicine 2002; 12: 229-35.
- 7) Catlin D, Howe C, Lasne F, Nissen-Lie G, Pascual JA, Saugy M: WADA Technical Document – TD2004EPO; http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/td2004epo_en.pdf
- 8) Azzazy HME, Mansour MMH, Christenson RH: Doping in the recombinant era: Strategies and counterstrategies. Clinical Biochemistry 2005; 38: 959-65.
- 9) Casoni I, Ricci G, Ballarin E, et al: Hematological indices of erythropoietin administration in athletes. Int J Sports Med 1993; 14: 307-11.
- 10) Segura J, Pascual JA, Gutiérrez-Gallego R: Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. Anal Bioanal Chem 2007; 388: 1521-29.
- 11) Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J: Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. Analytical Biochemistry 2002; 311: 119-26.
- 12) Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemmersbach P, Hallen J, Haug E, Bahr R: Effect of rhEPO administration on serum levels of STfR and cycling performance. Medicine & Science in Sports & Exercise 2000; 32: 1238-1243.
- 13) Abellan R, Ventura R, Pichini S, Palmi I, Bellver M, Olive R, Pacifici R, Pascual JA, Zuccaro P, Segura J: Effect of Physical Fitness and Endurance Exercise on Indirect Biomarkers of Recombinant Erythropoietin Misuse. Int J Sports Med 2007; 28: 9-15.
- 14) Abellan R, Ventura R, Pichini S, Remacha AF, Pascual JA, Pacifici R, Di Giovannandrea R, Zuccaro P, Segura J: Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004; 35: 1169-77.
- 15) Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P: Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. Blood 2001; 98: 3626-34.
- 16) Parisotto R, Gore CJ, Hahn AG, Ashenden MJ, Olds TS, Martin DT, Pyne DB, Gawthorn K, Brugnara C: Reticulocyte Parameters as potential Discriminators of Recombinant Human Erythropoietin Abuse in Elite Athletes. Int J Sports Med 2000; 21: 471-79.
- 17) Breidbach A, Catlin DH, Green GA, Tregub I, Truong H, Gorzek J: Detection of Recombinant Human Erythropoietin in Urine by Isoelectric Focusing. Clinical Chemistry 2003; 49: 901-07.
- 18) Lamon S, Robinson N, Mangin P, Saugy M: Detection window of Darbepoetin- α following one single subcutaneous injection. Clinical Chemical Acta 2007; 379: 145-49.

- 19) Beullens M, Delanghe JR, Bollen M: False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood* 2006; 107: 4711-13.
- 20) World Anti-Doping Agency (WADA): The 2008 Prohibited List – International Standard. WADA 2007; http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2008_List_En.pdf
- 21) World Anti-Doping Agency (WADA): Accredited Laboratories. WADA 2008; <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=333>
- 22) World Anti-Doping Agency (WADA): International Standard for Laboratories. WADA 2008; http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/lab_08_V_05.pdf
- 23) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Haemopoietic Growth Factors. In: Rang HP et al.: *Pharmacology – Fifth Edition*. ISBN 0443-071454, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto 2003, pp 336-39.
- 24) Evensen SA, Brinch L, Tjønnfjord GE, Wisløff F: Blodets og beinmargens celler. In: Evensen et al.: *Blodsykdommer, femte utgave*. ISBN 82-00-42552-5, Gyldendal Akademisk, Oslo 2003, pp 18-28.
- 25) Lasne F: Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *Journal of Immunological Methods* 2001; 253: 125-131.
- 26) Lasne F: Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *Journal of Immunological Methods* 2003; 276: 223-226.
- 27) World Anti-Doping Agency: Q&A Blood Doping. WADA 2006; http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/QA_Blood_Doping_En.pdf
- 28) World Anti-Doping Agency: International Standard for Laboratories – version 4.0. WADA 2004; http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/lab_aug_04.pdf
- 29) Lasne F, Thioulouse J, Martin L, de Ceaurriz J: Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: Interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis. *Electrophoresis* 2007; 28: 1875-1881.
- 30) Catlin D, Green G, Sekera M, Scott P, Starcevic B: False-positive Epo test concerns unfounded. *Blood* 2006; 108: 1778.
- 31) Lasne F: No doubt about the validity of the urine test for detection of recombinant human erythropoietin. *Blood* 2006; 108: 1778-1779.
- 32) Beullens M, Delanghe JR, Bollen M: False-positive detection of rhEpo remains a real concern. *Blood* 2006; 108: 1779-1780.
- 33) Jelkmann W: Novel Erythropoietic Agents: A Threat To Sportsmanship. *Medicina Sportiva* 2007; 11: 32-42.
- 34) Franke WW, Heid H: Pitfalls, errors and risks of false-positive results in urinary EPO drug tests. *Clinical Chimica Acta* 2006; 373: 189-190.
- 35) Bajla I, Holländer I, Minichmayr M, Gmeiner G, Reichel C: GASepo – a software solution for quantitative analysis of digital images in Epo doping control. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2005; 80: 246-270.
- 36) Birnie L: Hunting the men in black. *CycleSport* 2007; November 2007: 92-101.
- 37) Delanghe JR, Bollen M, Beullens M: Testing for recombinant erythropoietin. *Am. J. Hematology* 2008; 83: 237-241.
- 38) Morkeberg J, Saltin B, Belhage B, Damsgaard R: Blood profiles in elite cross-country skiers: A 6-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports* 2008:1-8.

- 39) Morkeberg J, Lundby C, Nissen-Lie G, Kjaerem Nielsen T, Hemmersbach P, Damsgaard R: Detection of Darbepoetin Alfa Misuse in Urine and Blood: A Preliminary Investigation. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 1742-1747.
- 40) Nissen-Lie G, Birkeland K, Hemmersbach P, Skibeli V: Serum sTfR Levels May Indicate Charge Profiling of Urinary r-hEPO in Doping Control. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36:588-593.
- 41) Solberg HE, Mørkrid L: Tolkning av laboratoriedata. In: Stokke O (red.): *Klinisk biokjemi og fysiologi*. ISBN 82-417-1213-8, Gyldendal Akademisk, Oslo 2000, pp 13-21.